

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Voltametrické stanovení metronidazolu na leštěné stříbrné pevné  
amalgamové kompozitní elektrodě**

**Voltammetric Determination of Metronidazol at a Polished  
Silver Solid Amalgam Composite Electrode**

Bakalářská práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

PRAHA 2010

Lucie Škvorová

## Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit optimální podmínky pro voltametrické stanovení metronidazolu, který se používá jako protinádorové léčivo. Byla sledována stabilita zásobního roztoku metronidazolu v deionizované vodě pomocí UV-VIS absorpční spektrofotometrie a nalezeno vhodné prostředí pro následující voltametrická stanovení na leštěné stříbrné pevné amalgamové kompozitní elektrodě (p-AgSA-CE). Závislost voltametrického chování metronidazolu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L na pH analyzovaného roztoku byla sledována pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) v rozsahu pH 2,1 až 12,1 ve vodném prostředí Brittonova-Robinsonova (BR) pufru. Pro elektrochemicky redukovatelnou nitro skupinu metronidazolu byl na základě pozorovaného chování navrhnut mechanismus voltametrické redukce na p-AgSA-CE. Pro proměření koncentračních závislostí bylo vybráno optimální prostředí vodného roztoku BR pufru o pH 4,0 pro obě voltametrické metody. Metodou DCV i DPV na p-AgSA-CE bylo měřeno koncentrační rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L metronidazolu s dosaženými mezemi stanovitelnosti ( $L_Q$ )  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L pro DCV a  $4 \cdot 10^{-6}$  mol/L pro DPV. Pro porovnání voltametrických metod s jinou analytickou metodou bylo proměřeno koncentrační rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L metronidazolu pomocí UV-VIS absorpční spektrofotometrie v deionizované vodě s dosaženou  $L_Q \sim 4 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Z tohoto plyne, že  $L_Q$  pro metronidazol dosažené metodou DCV na p-AgSA-CE, DPV na p-AgSA-CE a pomocí UV-VIS absorpční spektrofotometrie jsou za daných podmínek srovnatelné.

## Abstract

The aim of this work was to find out the optimal conditions for voltammetric determination of metronidazole, which is used as an anti-tumor drug. The stability of stock solution of metronidazole in deionized water was monitored using UV-VIS absorption spectrophotometry. Optimum conditions for voltammetric determination of metronidazole at a polished silver solid amalgam composite electrode (p-AgSA-CE) have been investigated. The dependence of voltammetric behavior of metronidazole ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) on pH of analyzed solution has been investigated using DC voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) in the pH range 2,1 – 12,1 in aqueous media of Britton-Robinson (BR) buffer. For electrochemically reducible nitro group of metronidazole, the mechanism of voltammetric reduction at p-AgSA-CE was proposed. The optimum medium of aqueous BR buffer pH 4.0 was chosen for measuring the concentration dependences for both voltammetric techniques. The concentration range  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L of metronidazole was measured using DCV and DPV at p-AgSA-CE with reached limits of quantification ( $L_Q$ s)  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L and  $4 \cdot 10^{-6}$  mol/L for DCV and DPV, respectively. For comparison of used voltammetric techniques with supplemental analytical method, the concentration range  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L of metronidazole was measured using UV-VIS absorption spectrophotometry in deionized water with reached  $L_Q \sim 4 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Hence it follows, the  $L_Q$ s for metronidazole reached using DCV at p-AgSA-CE, DPV at p-AgSA-CE, and UV-VIS absorption spectrophotometry are comparable under given conditions.

## **Předmětová hesla**

Analytická chemie

Elektrochemie

Nitroimidazolové deriváty

Voltametrie

## **Klíčová slova**

Metronidazol

DC voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie

Leštěná stříbrná pevná amalgamová kompozitní elektroda

UV-VIS absorpční spektrofotometrie

## **Subject Heading**

Analytical Chemistry

Electrochemistry

Nitroimidazol Derivatives

Voltammetry

## **Key Words**

Metronidazole

DC Voltammetry

Differential Pulse Voltammetry

Polished Silver Solid Amalgam Composite Electrode

UV-VIS Absorption Spectrophotometry

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>- 8 -</b>
1.1	Cíl práce	- 8 -
1.2	Studovaná látka	- 9 -
1.2.1	Biologické vlastnosti	- 10 -
1.2.2	Osud v organismu	- 10 -
1.2.3	Metabolismus	- 10 -
1.2.4	Eliminace	- 11 -
1.3	Metody stanovení nitroimidazolů	- 12 -
1.3.1	Separční metody	- 12 -
1.3.2	Spektrofotometrické metody	- 12 -
<b>2</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>- 13 -</b>
2.1	Chemikálie	- 13 -
2.2	Aparatura	- 14 -
2.2.1	Leštěná stříbrná pevná amalgamová kompozitní elektroda	- 14 -
2.3	Pracovní postupy	- 17 -
2.3.1	Předúprava elektrody	- 17 -
2.3.2	Voltametrické měření	- 17 -
2.4	Stabilita zásobního roztoku metronidazolu	- 21 -
<b>3</b>	<b>Voltametrická stanovení metronidazolu na p-AgSA-CE</b>	<b>- 23 -</b>
3.1	DC voltametrie	- 23 -
3.2	Diferenční pulzní voltametrie	- 32 -
3.3	UV-VIS spektrofotometrické stanovení metronidazolu (srovnávací metoda)	- 40 -
<b>4</b>	<b>Shrnutí dosažených výsledků</b>	<b>- 44 -</b>
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>- 45 -</b>
<b>6</b>	<b>Literatura</b>	<b>- 46 -</b>

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele prof. RNDr. Jiřího Barka, CSc. a konzultanta Mgr. Vlastimila Vyskočila, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, dne

.....

podpis

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc., Mgr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. a Mgr. Daně Deýlové za profesionální vedení, cenné připomínky k mé práci, vřelý a trpělivý přístup. Dále bych ráda vyjádřila dík všem členům Katedry analytické chemie PřF UK za pomoc v mnoha ohledech a vytvoření kolegiální atmosféry.

V neposlední řadě si poděkování zaslouží i mí rodiče, že mi umožnili studium na vysoké škole, a přátelé za podporu.

## Seznam použitých zkratek

$A$	absorbance
AgSA-CE	stříbrná pevná amalgamová kompozitní elektroda
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
$c$	molární koncentrace [mol/L]
C.A.S.	Chemical Abstract Service
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DCV	DC voltametrie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
$E$	potenciál [mV]
$E_p$	potenciál píku látky [mV]
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$I$	elektrický proud [nA]
$I_p$	elektrický proud píku látky [nA]
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
$L_Q$	mez stanovitelnosti [mol/L]
p-AgSA-CE	leštěná stříbrná pevná amalgamová kompozitní elektroda
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
pH <sub>poč.</sub>	počáteční pH Brittonova-Robinsonova pufru
pH <sub>kon.</sub>	výsledné pH směsi Brittonova-Robinsonova pufru a destilované vody
$R$	korelační koeficient
$s$	směrodatná odchylka
$s_r$	relativní směrodatná odchylka
$\tilde{x}$	medián
ZE	základní elektrolyt
$\lambda$	vlnová délka [nm]

# 1 Úvod

## 1.1 Cíl práce

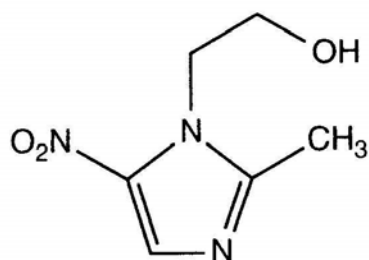
Předložená bakalářská práce tvoří součást projektu řešeného na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, který se zabývá studiem elektrochemického chování biologicky aktivních organických sloučenin, významných z hlediska ochrany životního prostředí, z hlediska farmaceutického, lékařského a toxikologického.

Cílem této práce je nalezení optimálních podmínek pro voltametrické stanovení metronidazolu v pufrovaném vodném prostředí pomocí technik DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na leštěné stříbrné pevné amalgamové kompozitní elektrodě (p-AgSA-CE) se záměrem dosáhnout co nejnižší meze stanovitelnosti  $L_Q$ . Dále pak přispět k rozšíření elektroanalytických metod, které jsou v současné době málo využívány a nahrazovány metodami spektrofotometrickými nebo separačními (vysokoúčinná kapalinová chromatografie).



## 1.2 Studovaná látka

vzorec: Strukturní



Sumární:  $C_6H_9N_3O_3$  (cit.<sup>1</sup>)

Název: 2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl)ethanol (cit.<sup>3</sup>)

Fyzikální vlastnosti:

Jemný bílý nebo nažloutlý krystalický prášek při teplotě 25 °C a tlaku 101325 Pa, těžce rozpustný ve vodě, acetonu, v lihu 96% a v dichlormethanu, velmi těžce rozpustný v etheru.<sup>3</sup>

Molekulová hmotnost:  $M_r = 171,15$  (cit.<sup>1</sup>)

Teplota tání: 159-163 °C (cit.<sup>1</sup>)

Disociační konstanta:  $pK_a = 2,38$  (cit.<sup>1</sup>)

Rozdělovací koeficient oktanol-voda:  $\text{Log } K_{ow} = -0,02$  (cit.<sup>1</sup>)

### 1.2.1 Biologické vlastnosti

Metronidazol je nitroimidazolový derivát, který vykazuje antimikrobiální a antiprotozonální účinky. Snadno prostupuje buněčnou membránou jednobuněčných organismů, bakterií a protozoí, do lidských buněk neproniká. Redukční potenciál metronidazolu je nižší než ferredoxinu. Tento protein je přítomen v anaerobních organismech a v metabolismu těchto organismů přenáší elektron. Nitro skupina metronidazolu je redukována v důsledku rozdílu redukčních potenciálů. Tento redukovaný produkt interaguje v anaerobních organismech s DNA a způsobí ztrátu spirálové struktury, dochází k inhibici syntézy nukleových kyselin, zastavuje se dělení buněk a dochází k buněčné smrti.<sup>5,6</sup>

Metronidazol je účinný na protozoa *Trichomonas vaginalis*, *Guardia lamblia* a *Balantidium coli*, také má silnou antibakteriální aktivitu proti gramnegativním tyčinkám *Bacteroides* spp, grampozitivním tyčinkám *Eubacterium* a *Clostridium* i proti grampozitivním kokům *Peptococcus* spp a *Peptostreptococcus* spp.<sup>4</sup>

### 1.2.2 Osud v organismu

Metronidazol je široce distribuován do většiny tělesných tkání a tekutin, včetně kostí, žluči, slin, pleurální a peritoneální tekutiny, poševního sekretu, semenné tekutiny. Prochází placentou a v mateřském mléce dosahuje stejných koncentrací jako v plazmě.<sup>4</sup>

U dospělých osob s normální funkcí ledvin a jater je plazmatický poločas metronidazolu 6-8 hodin. Poločas není ovlivněn změnami ve funkci ledvin, ale může být prodloužen v případě, že má pacient poruchu funkce jater. (U pacientů s poškozením jater od alkoholu byl poločas 18,3 hodin.)<sup>4</sup>

Distribuční objem může být snížen u starších pacientů ve srovnání s mladšími jedinci, důvodem může být snížení erytrocytů.<sup>4</sup>

### 1.2.3 Metabolismus

30-60% dávky podané perorálně se metabolizuje v játrech hydroxylací, oxidací postranního řetězce a konjugací s kyselinou glukuronovou. Hlavním metabolitem je 2-hydroxy metronidazol, který má rovněž antibakteriální a antiprotozonální účinky.<sup>4</sup>

#### 1.2.4 Eliminace

Metronidazol a jeho metabolity se vylučují převážně ledvinami (60-80%), pouze 6-15% je vylučováno do stolice. Metronidazol může způsobit tmavé zabarvení moči, které je dáno ve vodě rozpustným pigmentem, metronidazol hydrochloridem, vznikajícím štěpením metronidazolu.<sup>4</sup>

Z krve jsou metronidazol a jeho metabolity odstraněny hemodialýzou (poločas 2,6 hodin) nelze je však odstranit peritoneální dialýzou.<sup>4</sup>

Výskyt metronidazolu v léčivech

V dermatologii se používá ve formě gelů, roztoků, suspenzí a krémů, v gynekologii ve formě vaginálních tobolek.<sup>3</sup>

U metronidazolu nebyly prokázány žádné teratogenní účinky u gravidních zvířat, mutagenní aktivita byla vykázána u mnoha in vitro studií, ale in- vivo studie nevykazovaly žádný potenciál pro genetické poškození.<sup>2,3,4</sup>

### **1.3 Metody stanovení nitroimidazolů**

#### **1.3.1 Separační metody**

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) se používá ke stanovení metronidazolu za pomoci amperometrické detekce se zlatou mikroelektrodou a jako referentní elektroda se používá kalomelová. Rušivý vliv kyslíku byl odstraněn pomocí odvzdušněné vstřikovací trysky a odvzdušněného protektory u detekční cely. Jako pufr se používá  $\text{KH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ( $1 \cdot 10^{-3}$  mol/L), separační napětí je 5kV a dávkovací čas 10s. Limit detekce je  $6 \cdot 10^{-7}$  mol/L a relativní směrodatná odchylka je 3,9%. Tato metoda se uplatňuje hlavně při stanovení metronidazolu v lidské moči.<sup>8</sup>

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je další ze separačních metod, která se využívá při stanovení metronidazolu. Stacionární fází bývá sorbent, nejčastěji ZORBAX C8 a mobilní fází je obvykle acetonitril – fosfátový pufr o daném pH. Mobilní fáze je do kolony přiváděna eluční technikou o dávkovacím průtoku mobilní fáze 1-1,5 ml/min. Detekce je sledována pomocí UV-spektrofotometrie při vlnové délce 217-320 nm. Retenční čas metronidazolu je 3,51 min. Kalibrační závislost je lineární v rozmezí 10-50  $\mu\text{g/mL}$ . Metoda je citlivá, přesná a specifická. Lze takto stanovit metronidazol v suchých kapkách krve.<sup>9</sup>

Pro stanovení nitroimidazolů ve vejcích se používá HPLC s detekcí hmotnostní spektrometrie, kdy se vaječné vzorky nejprve extrahují v acetonitrilu a přidává se NaCl pro odstranění kontaminujících látek. Extrakt s acetonitrilem se promývá pomocí hexanu který je následně odpařen.<sup>10,11</sup>

#### **1.3.2 Spektrofotometrické metody**

Nitroimidazoly se stanoví spektrofotometricky tak, že se ke vzorkům přidá p-dimethylaminobenzaldehyd v poměru 1:1 a vznikne zeleno-žlutý roztok. Optimální podmínky pro diazotaci jsou teplota 0°C a doba 3 min. Barevné produkty absorbují při 404-406nm. Lambert-Beerův zákon je lineární v rozmezí 4,8-76,8 mg/ml. Azoprodukty jsou stabilní více jak týden. Nebyla zjištěna žádná interference s pomocnými látkami v tabletách přípravků. Tento postup je jednoduchý, rychlý a přesný.<sup>12</sup>

## 2 Experimentální část

### 2.1 Chemikálie

Studovaná látka Metronidazol (Sigma Aldrich). Zásobní roztok metronidazolu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/L byl připraven rozpuštěním 0,0431g látky ve 250 ml deionizované vody. Roztok byl uchován ve 250ml skleněné odměrné baňce opatřené zátkou ve tmě za laboratorní teploty.

Ostatní použité reagensy

Kyselina boritá (Lachema Brno, ČR), kyselina chlorovodíková (Lachema Brno, ČR), kyselina fosforečná (Lachema Brno, ČR), kyselina octová 99,8% (Lachema Ner, ČR), hydroxid sodný (Lachema Ner., ČR), chlorid draselný (Lachema Brno, ČR)

Brittonovy – Robinsonovy pufrы (BR pufrы) o potřebném pH byly připravovány mísením 0,2 mol/L roztoku hydroxidu sodného s roztokem obsahujícím 0,04 mol/L kyseliny borité, fosforečné a octové. Hodnoty pH byly měřeny pH metrem Jenway 4330 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou kalibrovaným standardními roztoky pufrů. Pro přípravu všech vodných roztoků byla použita deionizovaná voda Milipore USA. Veškeré používané roztoky byly uchovávány ve skleněných nádobách.

Roztok chloridu draselného byl připraven rozpuštěním 1,4912g látky v 50 mL deionizované vody. Roztok byl uchován v 50mL skleněné odměrné baňce opatřené zátkou při laboratorní teplotě.

## 2.2 Aparatura

Při všech voltametrických stanovení byla používána osobním počítačem řízená sestava Eco-Tribo Polarograf pracující se softwarem Polar Pro verze 2.0 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Software pracoval v operačním systému Microsoft Windows 3.11 (Microsoft Corporation, USA).

Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Leštěná stříbrná pevná amalgamová kompozitní elektroda (p-AgSA-CE; s průměrem disku 2,9 mm a povrchem disku 6,6 mm<sup>2</sup>; Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Praha, ČR) byla použita jako pracovní elektroda, jako referentní elektroda byla použita elektroda argentschloridová (3 mol L<sup>-1</sup> KCl) typu ETP CZ/R0100X a jako pomocná elektroda pak platinová drátková elektroda typu ETP CZ P00906 (obě Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Při metodě DPV byly na pracovní elektrodu vkládány pulzy o šířce 100 ms a výšce -50 mV. Rychlost nárůstu potenciálu činila 20 mV s<sup>-1</sup>, stejně jako při metodě DCV.

Spektrofotometrická měření stability zásobního roztoku byla prováděna na přístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA), ovládaném programem UV-Visible ChemStation (Agilent Technologies, USA), v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 mm (Hellma, Nizozemí).

### 2.2.1 Leštěná stříbrná pevná amalgamová kompozitní elektroda

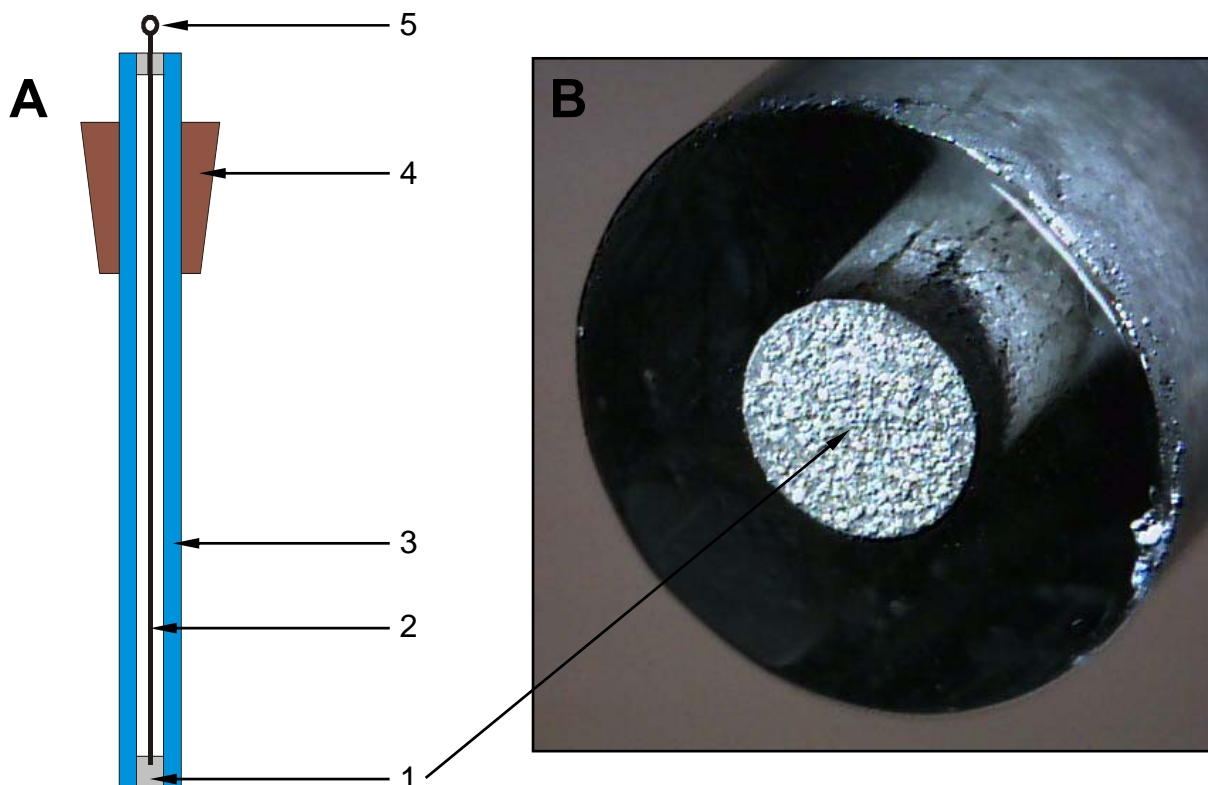
Ideální pracovní elektrody by měly mít nízký odpor, chemickou a elektrochemickou inertnost v širokém rozsahu pracovních potenciálů, široké potenciálové okno, snadné obnovení elektrodového povrchu, nízkou cenu a měly by být netoxické.<sup>13</sup>

Veškeré body splňuje rtuťová elektroda (např. rtuťová kapková elektroda - DME, visící rtuťová kapková elektroda - HDME, nebo rtuťové filmové elektrody - MFE) kromě toxicity. Ekologické a bezpečnostní předpisy jsou ve světě i v ČR velice přísné a omezují používání rtuťových elektrod, proto se objevují snahy tyto elektrody nahradit jinými pevnými materiály. V posledních letech byla věnována pozornost vývoji pevných nertuťových pracovních elektrod mezi které patří i kompozitní elektrody. Tyto elektrody jsou vytvořené z materiálu představujícího směs minimálně jednoho izolátoru (ceresinový vosk, teflon, polyethylen, metakrylátové nebo epoxidové pryskyřice, atp.) a jednoho vodiče (uhlíkový prášek, práškové kovy, atd.). Jejich výhody jsou jak v elektrochemických, fyzikálních ale i v mechanických vlastnostech. Jsou velmi stabilní a mechanicky odolné, lze je leštit, mají dlouhou životnost a mohou se používat ve velmi pozitivních potenciálových oblastech. Prvotní uplatnění našly

kovové kompozitní a grafitové kompozitní elektrody v anodické rozpouštěcí voltametii ASV, při voltametrickém stanovení iontů kovů.<sup>13,14</sup>

Pevné či pastové amalgámové elektrody, které byly vyvinuty na Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, mají celou řadu předností. V první řadě nejsou toxické, nenarušují životní prostředí, mají srovnatelné potenciálové okno s visící kapkovou rtuťovou elektrodou a je možná jejich snadná elektrochemická předúprava. Jsou mechanicky robustní a tudíž kompatibilní s měřením v proudících kapalinách. Obecně jsou vhodné pro stanovení redukovatelných látek.<sup>13</sup>

Pevná stříbrná amalgámová kompozitní elektroda (AgSA-CE) je připravena z amalgámu, stříbrného prášku a epoxidové pryskyřice. Představuje kombinaci mezi pevnou kompozitní elektrodou a pevnou amalgámovou elektrodou, neobsahuje žádnou kapalnou rtuť a současně vykazuje elektrochemické vlastnosti obdobné rtuťovým elektrodám. AgSA-CE má široké analytické aplikace (stanovení kadmia, olova, mědi, thalia, kyseliny askorbové, p-nitrofenolu, jodičnanů, nukleové báze adeninu) a je vhodná pro katodická i anodická stanovení. Dosažené meze jsou dostatečné pro většinu praktických aplikací.<sup>13</sup>



**Obr. 1.** Schéma p-AgSA-CE (A) a detailní fotografie povrchu leštěné elektrody (B). 1 - kompozitní směs stříbrného amalgamu a epoxidové pryskyřice; 2 - měděný drátek; 3 - skleněná tuba; 4 - plastový úchyt; 5 - elektrický kontakt.

Možný způsob přípravy AgSA-CE: amalgám vzniklý smícháním stříbrných částic (o velikosti řádu  $\mu\text{m}$ ) s kapalnou rtuť se nechá za laboratorní teploty 1 den tuhnout. Pro dosažení čisté formy se ztuhlý amalgam posype stříbrným práškem. Amalgam se poté zhomogenizuje s epoxidovou pryskyřicí (v poměru 80 % stříbrný amalgam a 20 % epoxidová pryskyřice). Kompozitní směs je vtlačena do těla elektrody (skleněná, teflonová či polyethylenová trubička). Nakonec se do měkkého kompozitního materiálu vsune elektrický kontakt a povrch elektrody se zbrousí smirkovým papírem a aluminou.

Takto připravená leštěná elektroda se dále může modifikovat elektrochemicky generovaným rtuťovým filmem nebo krátkým ponořením do kapalné rtuti (na povrchu elektrody se vytvoří rtuťový meniskus).<sup>15</sup>



## 2.3 Pracovní postupy

### 2.3.1 Předúprava elektrody

Předúprava p-AgSA-CE obsahuje dvě základní operace

1. Leštění - bylo prováděno vždy na začátku pracovního dne, či kdykoli v případě zhoršení proudové odezvy, zhoršení citlivosti či opakovatelnosti. Jedná se o mechanické obnovení povrchu elektrody bez použití aluminy.

2. Regenerace – byla prováděna před každým voltametrickým měřením (kromě měření opakovatelnosti, měřeno bez regeneračního kroku). Na elektrodu byly vkládány regenerační potenciály (pulzy) po dobu 30s s délkou pulzu 0,1s. Bylo nezbytné nalézt konkrétní optimální regenerační potenciály pro jednotlivá pH základního elektrolytu (ZE). Regenerační potenciály příslušných pH byly uvedeny v **tabulce I**.

### 2.3.2 Voltametrické měření

Voltametrické křivky byly měřeny následujícím způsobem: Nejprve byly připraveny roztoky k měření tak, že byl do 10mL odměrných baněk odpipetován 1 mL zásobního roztoku metronidazolu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/L (vzorek) nebo 1 mL destilované vody (slepý pokus) a doplněn po rysku BR - pufrem o příslušném pH. Takto připravené roztoky byly kvantitativně převedeny do polarografické nádoby. V polarografické nádobce byl roztok zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Dusík byl do roztoku přiváděn přes promývačku, která byla zařazena před nádobku a obsahovala destilovanou vodu. Po aplikaci regeneračního kroku byla zaznamenána voltametrická křivka. Voltametrické křivky slepého vzorku i stanovovaného metronidazolu byly měřeny pětkrát za sebou. Všechna měření byla provedena za laboratorní teploty.

**Tabulka I**

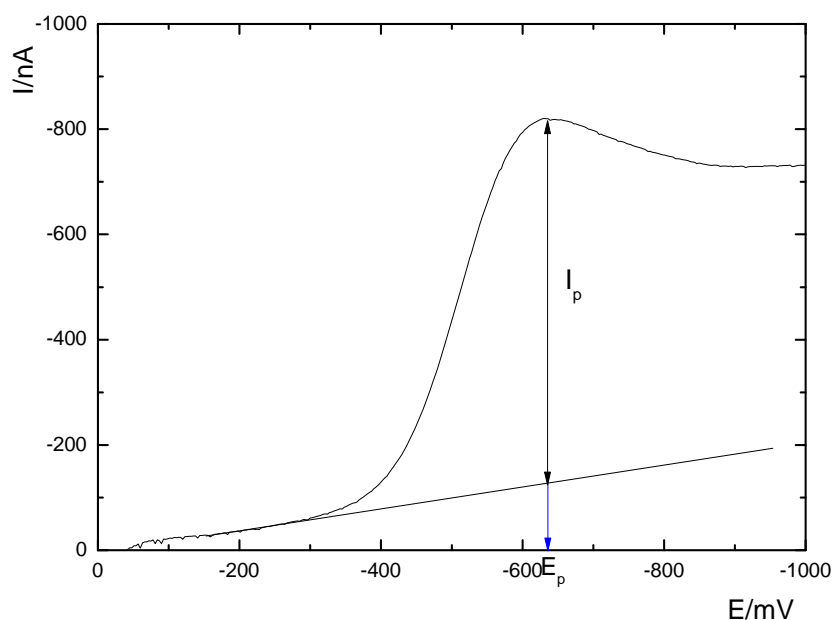
Optimální regenerační potenciály  $E_{in}$  (počáteční) a  $E_{fin}$  (konečný) používané při měření ve vodných roztocích BR pufrů o počátečním pH – pH<sub>poč.</sub> a konečném pH – pH<sub>kon.</sub>

pH <sub>poč.</sub>	pH <sub>kon.</sub>	$E_{in}/mV$	$E_{fin}/mV$
2,1	2,2	300	-1100
3,1	3,1	250	-1000
4,0	4,0	150	-1100
5,1	5,1	200	-1200
6,1	6,2	150	-1300
7,0	7,1	100	-1350
8,0	8,0	0	-1400
9,0	8,9	0	-1400
10,0	10,0	-100	-1600
11,1	10,8	-100	-1500
12,1	12,1	-200	-1550

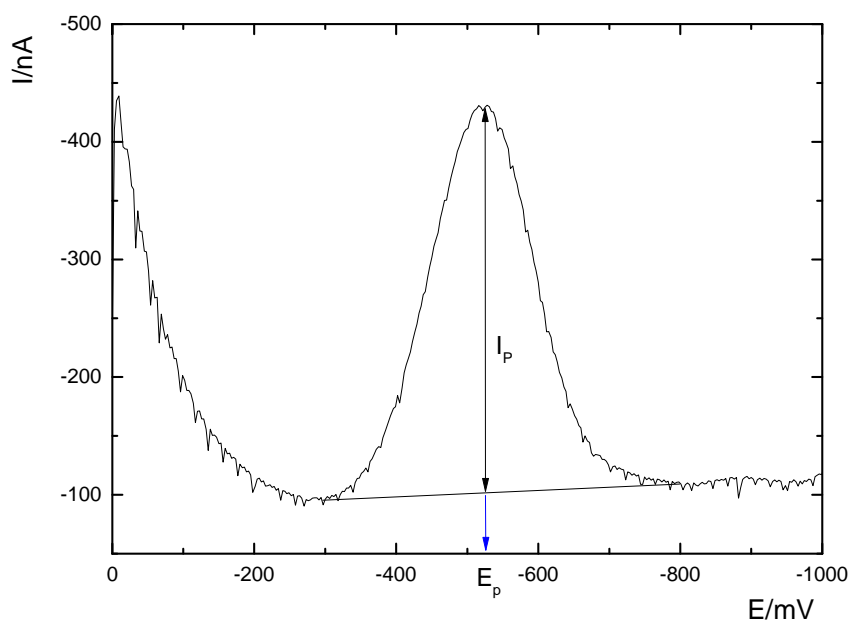
### *Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat*

K provádění výpočtů a tvorbě grafů, které se nacházejí v této práci bylo použito MS Excel (2003, 2007) Microsoft Corporation a Origin 8 (Corporation, USA Origin LAB). Statistické vyhodnocení opakovatelnosti voltametrických měření na p-AgSA-CE bylo provedeno dle zavedených chemometrických norem pro tento typ souboru dat. Mez stanovitelnosti byla vypočtena jako desetinásobek směrodatné odchylky deseti měření sledované látky o koncentraci v nejnižším bodě příslušné kalibrační přímky.

Na **obr. 2** je uvedeno vyhodnocení získaných DC voltamogramů, naměřené DP voltamogramy jsou na **obr. 3**. Vyhodnocením voltamogramů obou metod byly získány potenciály píku  $E_p$  a proudy píku  $I_p$ .



**Obr. 2.** Způsob vyhodnocování DC voltamogramu metronidazolu. DC voltamogram metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L), měřeno na p-AgSA-CE ve vodném prostředí BR-pufu o pH 4,0.  $I_p$  značí proud píku,  $E_p$  potenciál píku.



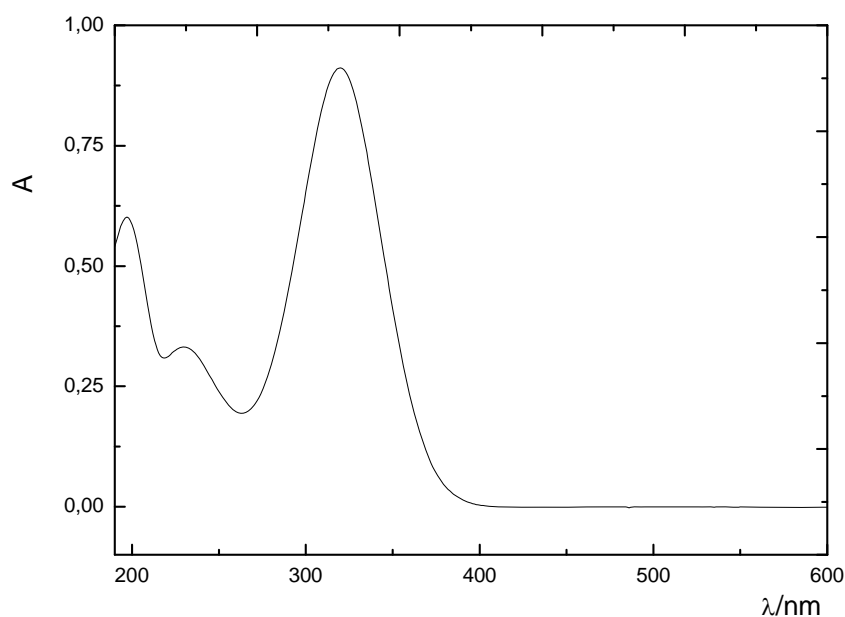
**Obr. 3.** Vyhodnocení DP voltamogramu Metronidazolu. DP voltamogram metronidazolu (  $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L), měřeno na p-AgSA-CE ve vodném prostředí BR-pufry o pH 4,0.  $I_p$  proud píku,  $E_p$  potenciál píku.

## 2.4 Stabilita zásobního roztoku metronidazolu

Stabilita zásobního roztoku metronidazolu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/L byla sledována spektrofotometricky proti destilované vodě v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 0,1 cm. Absorbance zásobního roztoku metronidazolu byla měřena v rozmezí vlnových délek 190 – 1100 nm. Absorpční spektrum je zobrazeno na obr.4.

Hodnota molárního absorpčního koeficientu metronidazolu odpovídala  $9117 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$  při 320 nm.

Výsledky měření stability metronidazolu jsou uvedeny v tabulce II. Z výsledků je patrné, že během celého měření se koncentrace metronidazolu uchovávaném ve tmě za laboratorní teploty prakticky nesnížila. Zásobní roztok metronidazolu lze považovat za těchto podmínek za stálý po dobu 100 dní .



**Obr. 4.** Absorpční UV-VIS spektrum zásobního roztoku metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/L). Měřeno proti destilované vodě v křemenných kyvetách o optické délce 1 mm.

## Tabulka II

Spektrofotometrické měření stálosti zásobního roztoku metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/L) v destilované vodě. Hodnoty relativní absorbance jsou vztažené k nultému dni, kdy byl zásobní roztok připraven.

Den	$A_{320}$	[%]
0	0,9121	100,00
1	0,9117	99,95
5	0,9118	99,96
10	0,9121	99,99
20	0,9122	100,00
30	0,9118	99,97
60	0,9120	99,99
80	0,9123	100,00
100	0,9118	99,97

### 3 Voltametrická stanovení metronidazolu na p-AgSA-CE

#### 3.1 DC voltametrie

Nejprve byl studován vliv pH na DC voltamogramy metronidazolu na p-AgSA-CE ve vodných roztocích, které obsahovaly BR-pufry o daném pH. V těchto roztocích byla koncentrace metronidazolu  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Závislost byla měřena v rozsahu pH 2 – 12. Studovaná látka poskytuje v tomto rozmezí pH jeden dobře vyvinutý pík. Získané údaje jsou znázorněny na **obr.5**, kde jsou uvedeny sudé hodnoty pH, **obr.6** zobrazuje liché hodnoty pH.

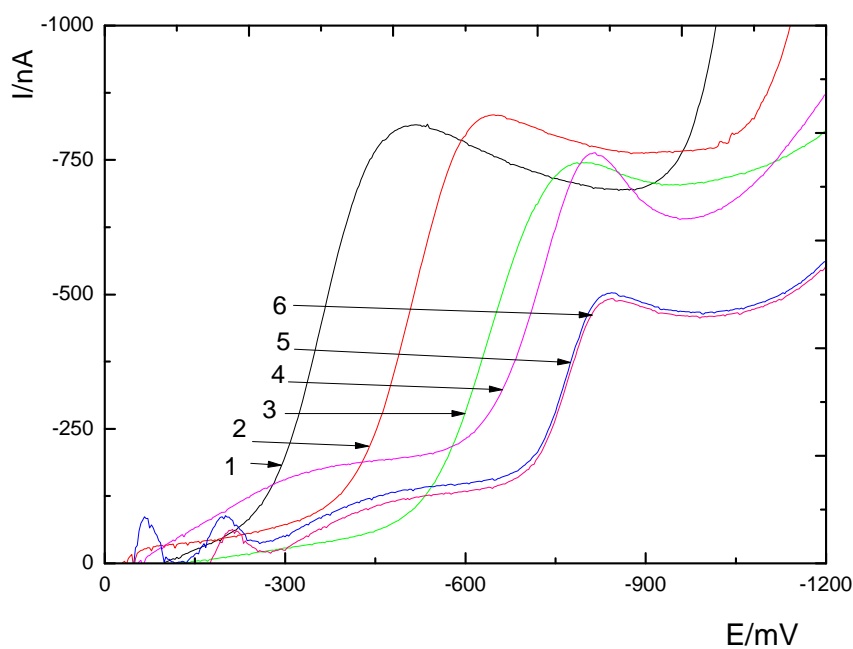
### Tabulka III

Vliv pH na DC voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L), měřeno na p-AgSA-CE ve vodném prostředí BR pufrů.

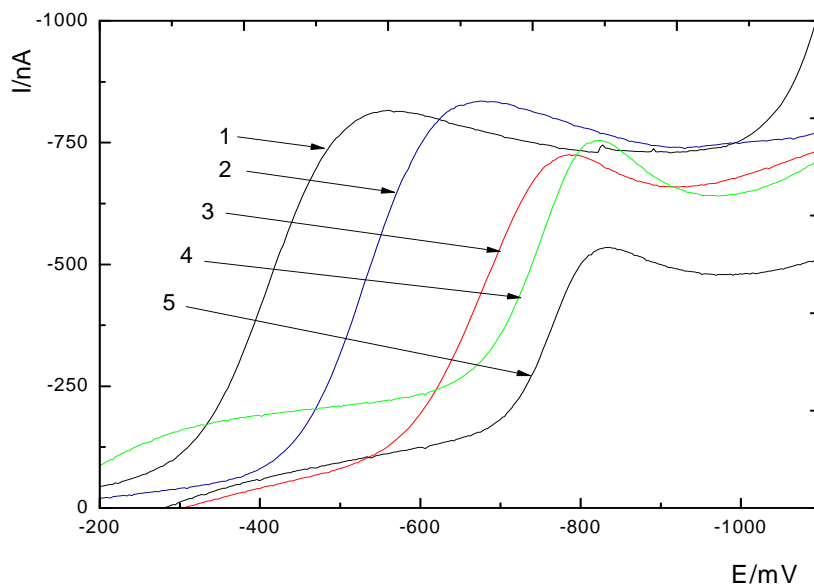
pH <sub>poč.</sub>	pH <sub>kon.</sub>	-E <sub>p</sub> [mV]	-I <sub>p</sub> [nA]
2,1	2,2	491	605,6
3,1	3,1	543	665,3
4,0	4,0	644	706,5
5,1	5,1	681	710,8
6,1	6,2	787	631,4
7,0	7,1	782	516,4
8,0	8,0	814	523,7
9,0	8,9	823	484,2
10,0	10,0	826	444,5
11,1	10,8	829	343,1
12,1	12,1	840	318,0

pH<sub>poč.</sub> - počáteční pH použitého BR-pufu, pH<sub>kon.</sub> – výsledné pH BR pufru a destilované vody,  
E<sub>p</sub> – potenciál píku, I<sub>p</sub> – proud píku.





**Obr.5.** DC voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L), měřeno na p-AgSA-CE ve vodných roztocích BR pufrů. Zobrazeny sudé hodnoty pH: 2,1 (1); 4,0 (2); 6,1 (3); 8,0 (4); 10,0 (5); 12,4 (6).



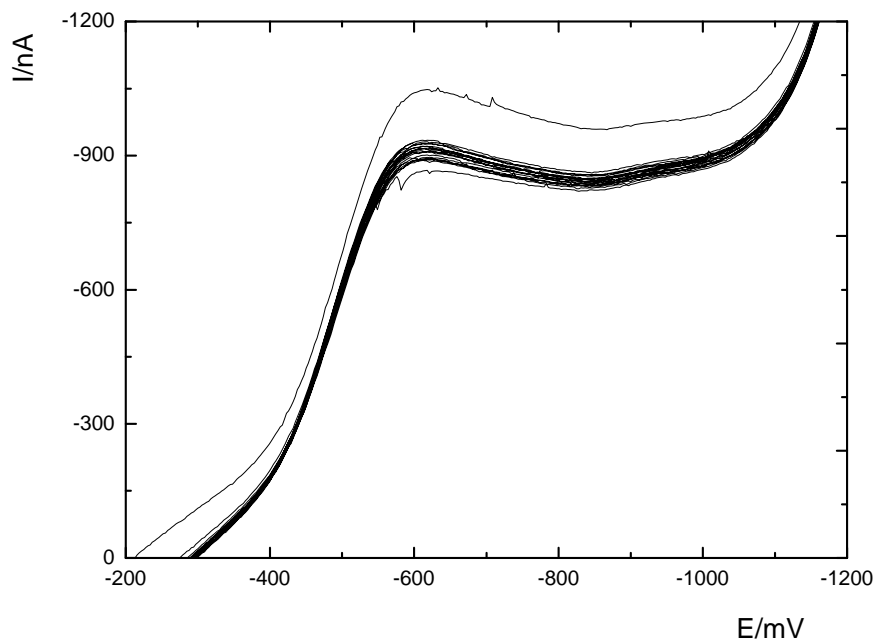
**Obr.6.** DC voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L), měřeno na p-AgSA-CE ve vodných roztocích BR pufrů. Zobrazeny liché hodnoty pH 3,1 (1); 5,1 (2); 7,0 (3); 9,0 (4); 11,1 (5).

K sestavení kalibrační závislosti DC voltametrií bylo vybráno jako optimální pH 4,0. Při tomto pH poskytuje metronidazol nejlépe vyvinutý pík a odpovídá nejvyšším hodnotám proudu.

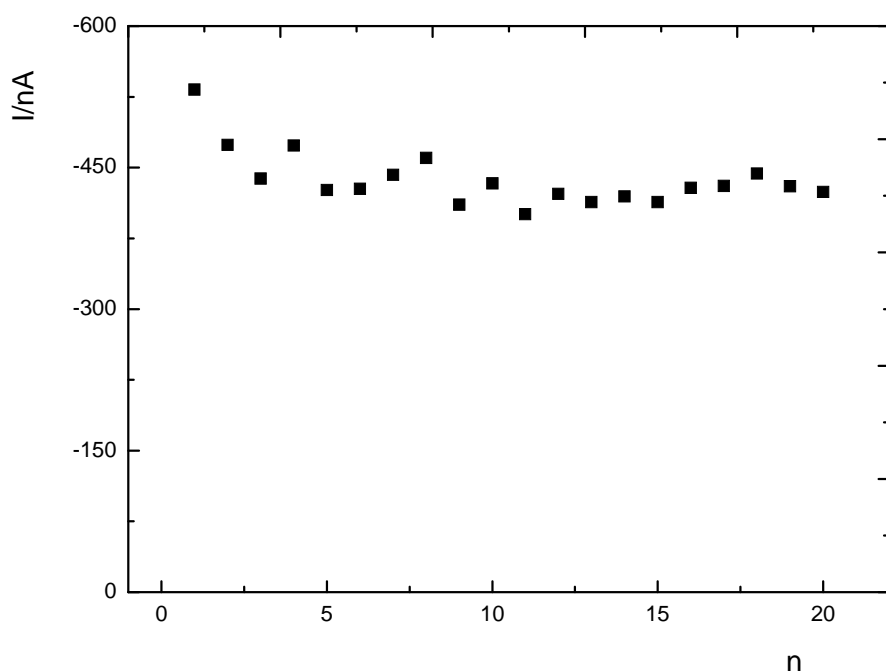
Při voltametrickém měření metronidazolu ve vodném roztoku BR-pufu o pH 4,0 bez užití regeneračních potenciálů vkládaných na p-AgSA-CE byly získány voltametrické křivky, které nedosahovaly tak vysokých hodnot proudu. (**Obr.7.** a **Obr.8.**). Relativní směrodatná odchylka výběru, která vyjadřovala opakovatelnost měření bez regeneračního kroku činila 6,89%.

Na **Obr.9.** a **Obr.10.** jsou zobrazeny DC voltamogramy měřené na p-AgSA-CE s vkládanými regeneračními potenciály  $E_{in} = 150 \text{ mV}$  a  $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$  po dobu 30s před každým měřením. Při aplikaci regeneračních potenciálů došlo ke zvýšení proudové odezvy a opakovatelnost se zlepšila (RSD se snížila na 3,02%). Výhodou byla také stabilizace signálu.

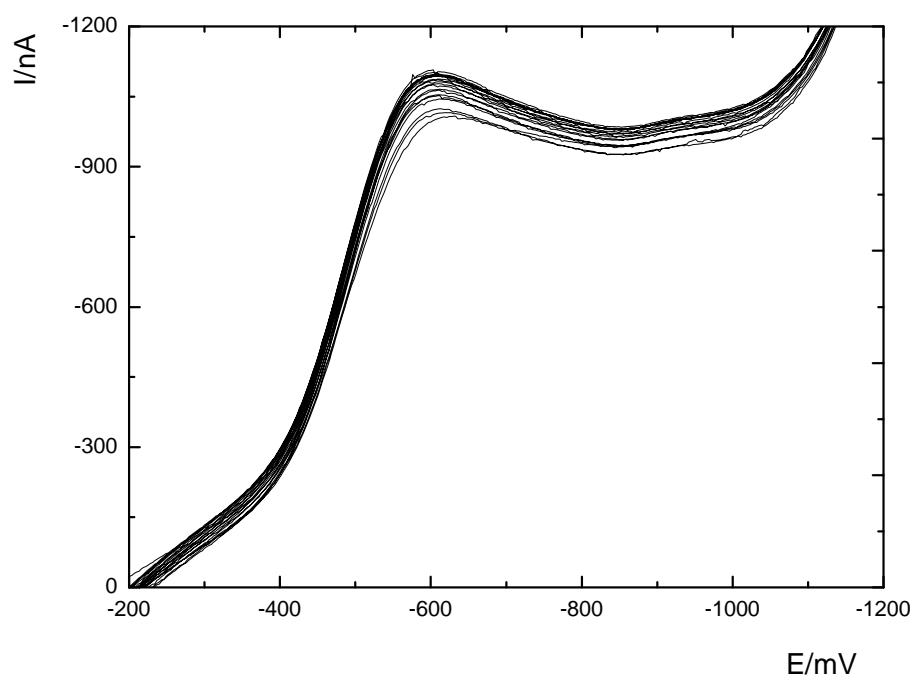
Součástí koncentračních závislostí se stal krok aplikace regeneračních potenciálů před každým měřením. Rozmezí koncentračních závislostí metronidazolu bylo ve zvoleném prostředí (pH 4) určeno od  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ . (**Obr.11,** **12**). Při nejnižší zvolené koncentraci, tj  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$  byly voltametrické křivky velmi obtížně vyhodnotitelné, a proto lze tuto koncentraci považovat za zvolených podmínek jako nejnižší vyhodnotitelnou. Závislosti proudu píku na koncentraci metronidazolu jsou zobrazeny na **Obr.13** a **14**.



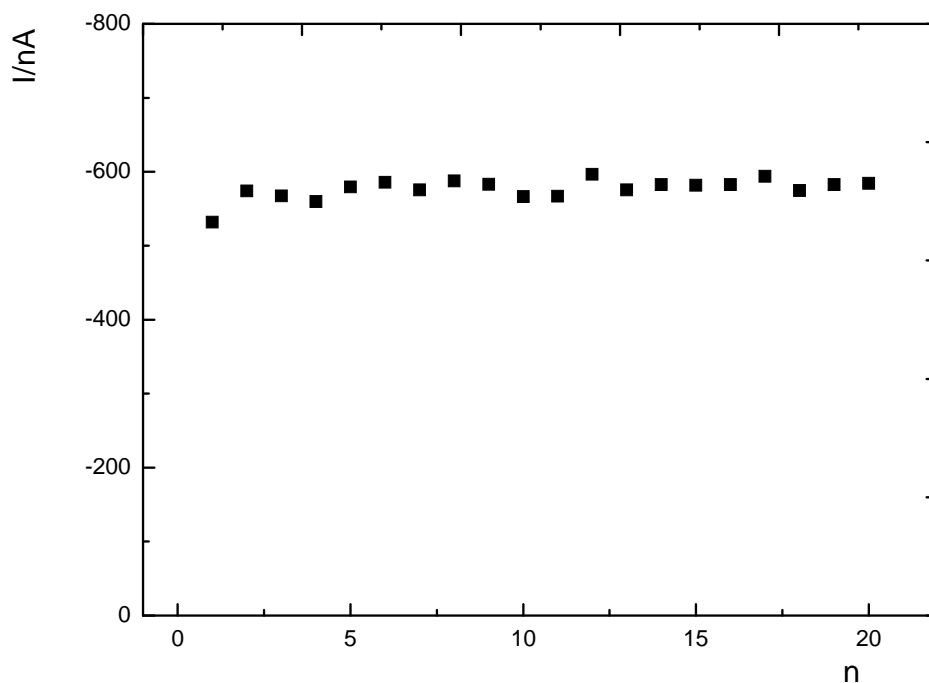
**Obr.7.** DC voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na p-AgSA-CE ve vodném prostředí BR pufru o pH 4,0. Měřeno bez regeneračních potenciálů, počet měření  $n = 20$ .



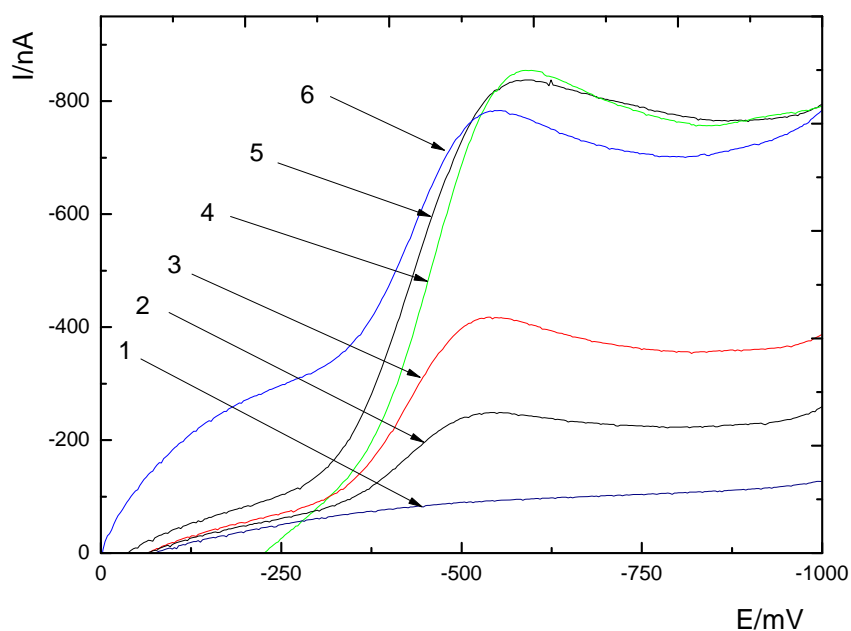
**Obr.8.** Závislost proudu píku metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na pořadovém čísle měření bez aplikace regeneračních potenciálů. Měřeno DC voltametří na p-AgSA-CE ve vodném prostředí BR pufru o pH 4,0; počet měření  $n = 20$ .



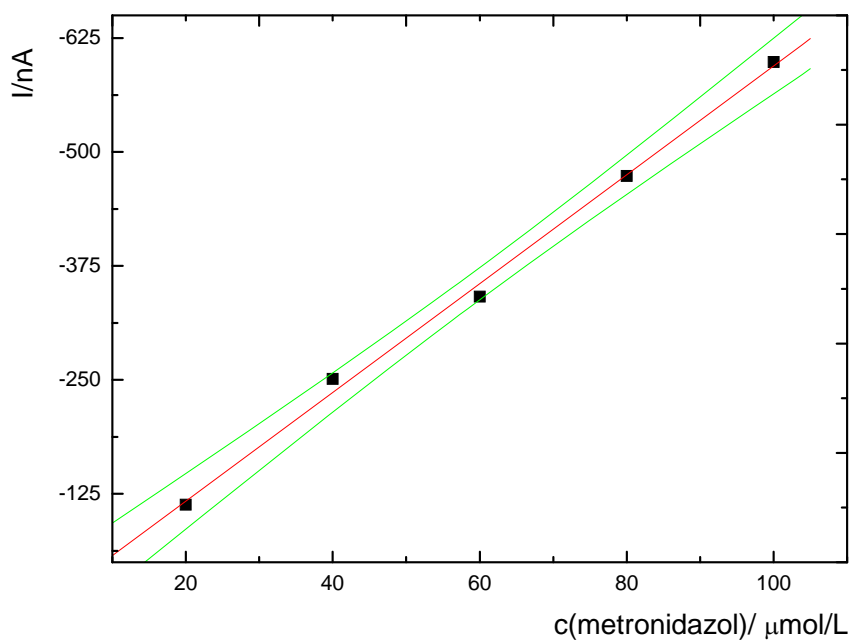
**Obr.9.** DC voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ) na p-AgSA-CE ve vodném prostředí BR pufru o pH 4,0. Měřeno s vložením regeneračních potenciálů před každým měřením ( $E_{\text{in}} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1100 \text{ mV}$ ), počet měření  $n = 20$ .



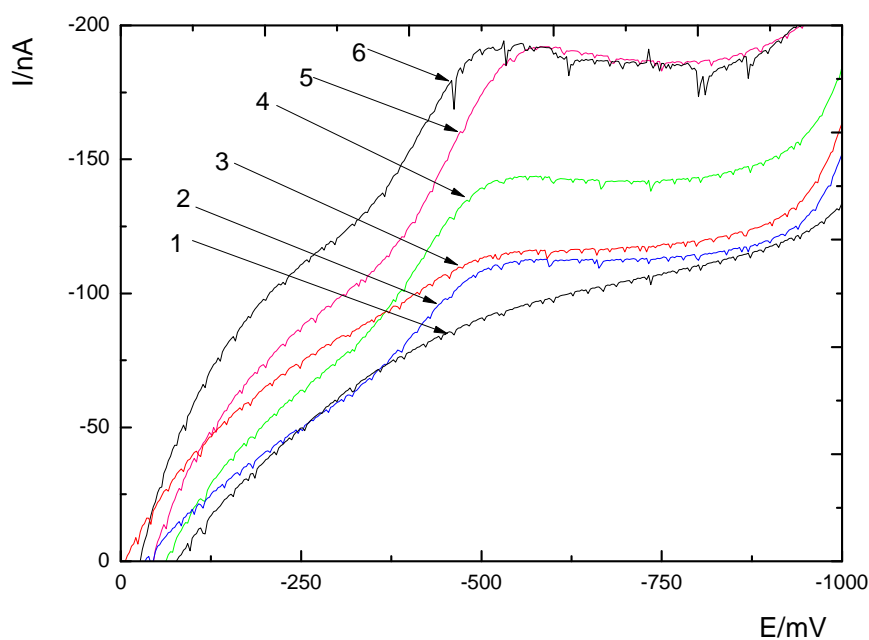
**Obr.10.** Závislost proudu píku metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ) na pořadovém čísle měření s užitím regeneračních potenciálů před každým měřením ( $E_{\text{in}} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1100 \text{ mV}$ ). Měřeno DC voltametří na p-AgSA-CE ve vodném prostředí BR pufru o pH 4,0; počet měření  $n = 20$ .



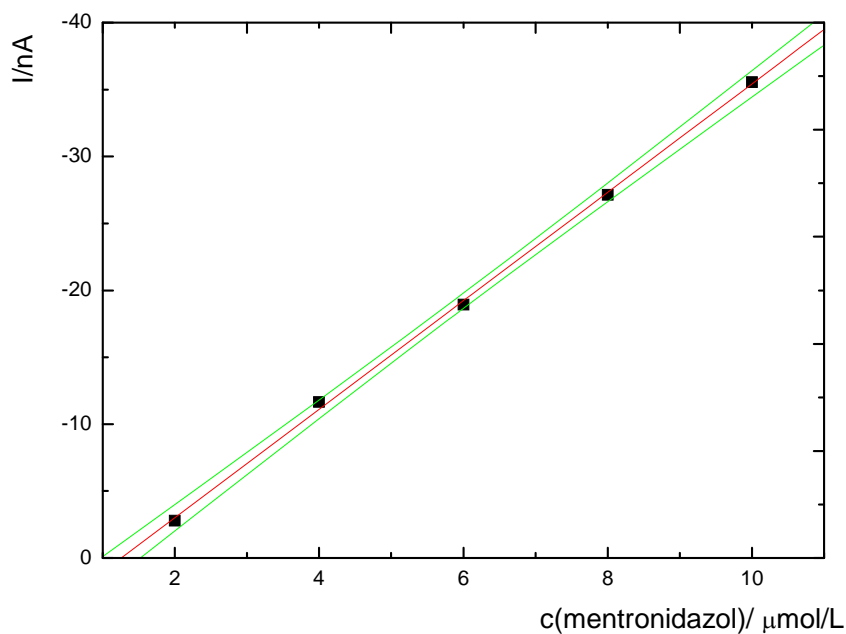
**Obr.11.** DC voltamogramy metronidazolu v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-5}$  -  $10 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Základní elektrolyt (1); koncentrace metronidazolu v mol/L  $2 \cdot 10^{-5}$  (2);  $4 \cdot 10^{-5}$  (3);  $6 \cdot 10^{-5}$  (4);  $8 \cdot 10^{-5}$  (5);  $10 \cdot 10^{-5}$  (6). Měřeno ve vodném roztoku BR pufru o pH 4,0 s aplikací regeneračních potenciálů ( $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1100$  mV).



**Obr.12.** Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-5}$  -  $10 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Měřeno DC voltametrií na p-AgSA-CE ve vodném roztoku BR pufru o pH 4,0 s aplikací regeneračních potenciálů ( $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1100$  mV).



**Obr.13.** DC voltamogramy metronidazolu na p-AgSA-CE v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $10 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Základní elektrolyt (1), koncentrace metronidazolu(mol/L)  $2 \cdot 10^{-6}$  (2);  $4 \cdot 10^{-6}$  (3);  $6 \cdot 10^{-6}$  (4);  $8 \cdot 10^{-6}$  (5);  $10 \cdot 10^{-6}$  (6). Měřeno ve vodném roztoku BR-pufu o pH 4,0 s vložením regeneračních potenciálů ( $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1100$  mV).



**Obr.14.** Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $10 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Měřeno DC voltametrií na p-AgSA-CE ve vodném roztoku BR-pufu o pH 4 s aplikací regeneračních potenciálů ( $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1100$  mV).

Vyhodnocení kalibračních přímek stanovení metronidazolu DC voltametrií ve vodném prostředí BR- pufru o pH 4,0 je shrnuto tabulce IV, v tabulce V je vyhodnocena opakovatelnost měření nejvyšší a nejnižší měřené koncentrace metronidazolu za aplikace regeneračních potenciálů  $E_{in} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{fin} = -1100 \text{ mV}$ .

**Tabulka IV**

Parametry kalibračních přímek pro stanovení metronidazolu DC voltametrií na p-AgSA-CE ve vodném prostředí BR-pufu o pH 4,0.

$c \text{ [mol/L]}$	Směrnice [mA·L/mol]	Úsek [nA]	$R$	$L_Q \text{ [mol/L]}$
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	6,20	-23,8	-0,999	-
$(2-10) \cdot 10^{-6}$	4,05	-5,1	-0,999	$2,4 \cdot 10^{-6}$

**Tabulka V**

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti stanovení metronidazolu DC voltametrií na p-AgSA-CE pro nejvyšší koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  a nejnižší  $2 \cdot 10^{-6}$  ve vodném prostředí BR- pufru o pH 4,0; počet měření  $n = 10$ , hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

$c \text{ [mol/L]}$	$\tilde{x} \text{ [nA]}$	$L_{1,2} \text{ [nA]}$	$s \text{ [nA]}$	$s_r \text{ [%]}$
$1 \cdot 10^{-4}$	-579,5	3,6	5,5	0,94
$2 \cdot 10^{-6}$	-3,21	0,42	0,55	16,7

### 3.2 Diferenční pulzní voltametrie

Voltametrické chování metronidazolu bylo dále sledováno DP voltametrií. Vliv pH byl sledován obdobně jako u DCV (kap.3.1). Rozmezí pH bylo realizováno pomocí BR-pufu a koncentrace metronidazolu byla v těchto roztocích  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Rozsah pH BR-pufu byl 2-12. Hodnoty proudů  $I_p$  a potenciálů píků  $E_p$  pro jednotlivá pH pufu ve vodných roztocích jsou uvedeny v tabulce VIII.

Získané voltamogramy metronidazolu v závislosti na pH jsou zobrazeny na **obr. 15.** a **obr. 16.** Analyzovaná látka vykazuje analogické chování jako u DC techniky, v celém rozsahu pH byl zaznamenán jeden dobře vyvinutý pík, který byl následně vyhodnocen.

**Tabulka VI**

**Chybi popis tabulky**

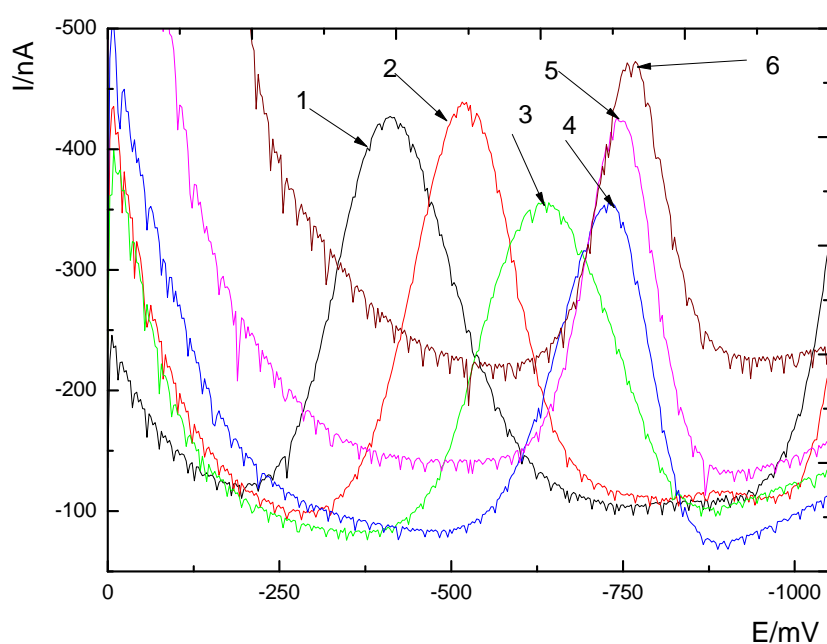
pH.	$-E_p$ [mV]	$-I_p$ [nA]
2,1	412	310,0
3,1	415	312,3
4,0	520	333,0
5,1	544	278,7
6,1	637	262,4
7,0	679	287,2
8,0	730	276,0
9,0	739	301,6
10,0	747	285,9
11,1	757	280,3
12,1	766	248,1

pH. –pH použitého BR-pufu,  $E_p$  – potenciál píku,  $I_p$  – proud píku

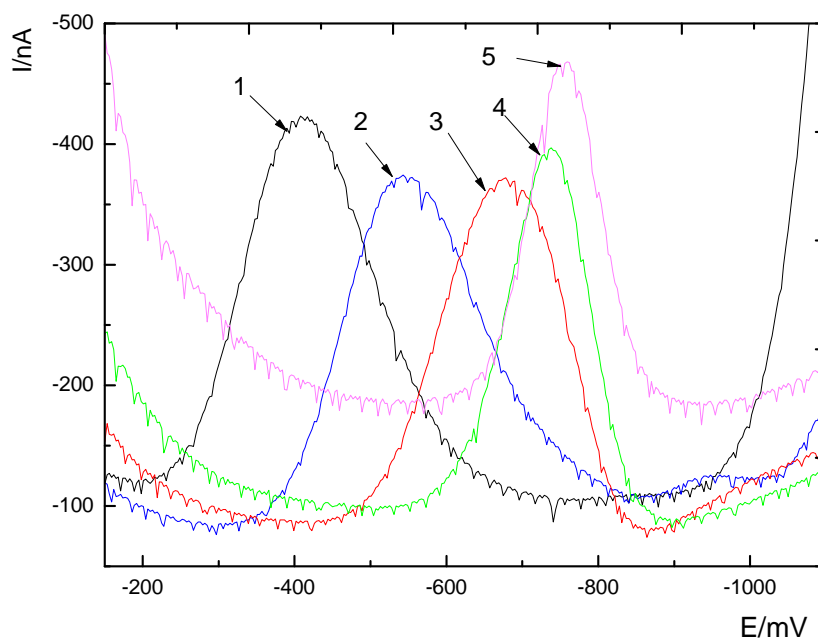
Kalibrační závislosti byly sestaveny analogicky jako u techniky DC. Jako optimální pH bylo zvoleno pH BR-pufu 4,0, protože při tomto pH poskytuje metronidazol nejlépe vyvinutý pík a nejvyšší proud. Při měření analyzované látky bez regeneračního kroku docházelo k snížení proudu píků, opakovatelnost měření po vyřazení odlehlých hodnot činila 1,7 %. Po aplikaci



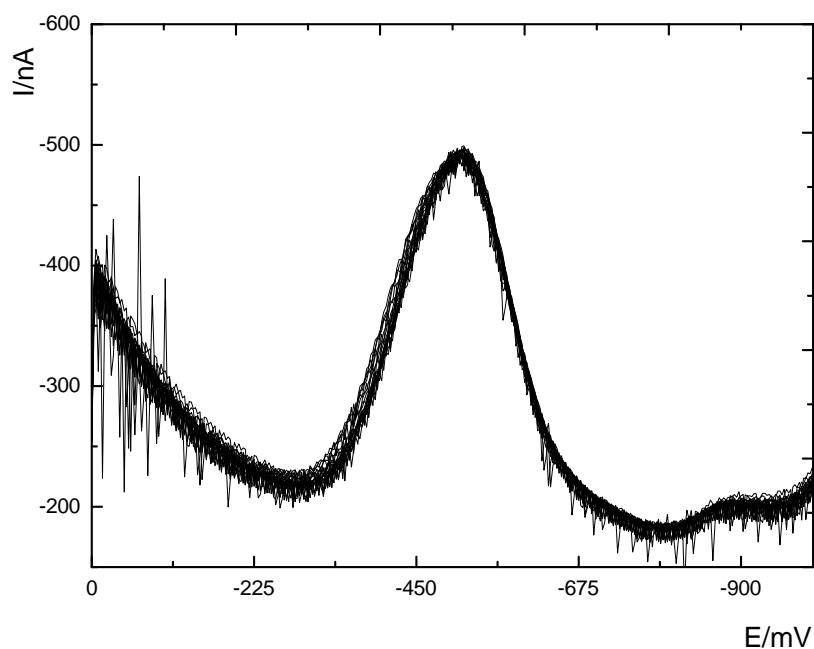
regeneračních potenciálů na p-AgSA-CE ( $E_{\text{in}} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1100 \text{ mV}$ ) se stabilizovala proudová odezva, opakovatelnost po vložení regeneračního kroku byla 1,5 % a zvýšil se i proud píku. I u této metody bylo žádoucí aplikovat před každým měřením na p-AgSA-CE regenerační potenciály.



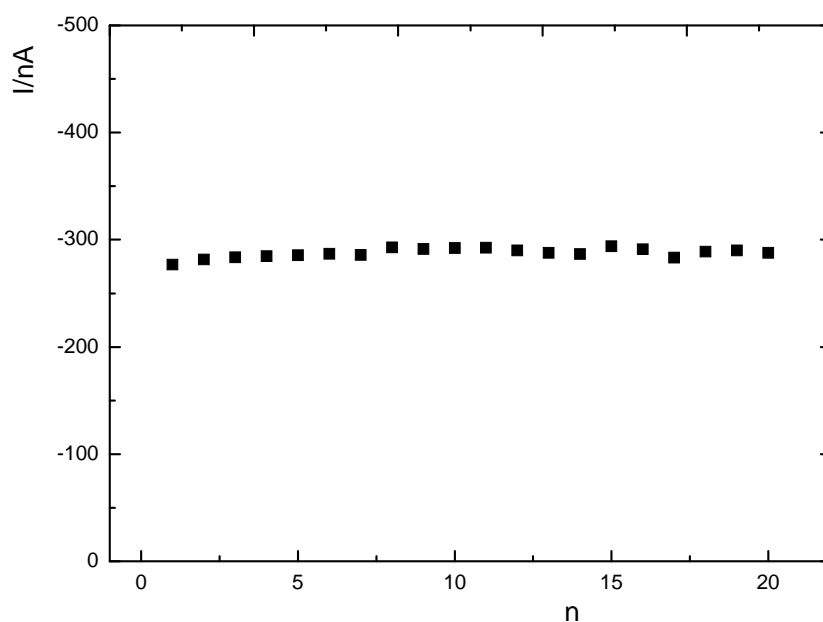
**Obr.15.** DP voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ), měřeno na p-AgSA-CE ve vodných roztocích BR pufrů. Zobrazeny sudé hodnoty pH: 2,1 (1); 4,0 (2); 6,1 (3); 8,0 (4); 10,0 (5); 12,1 (6).



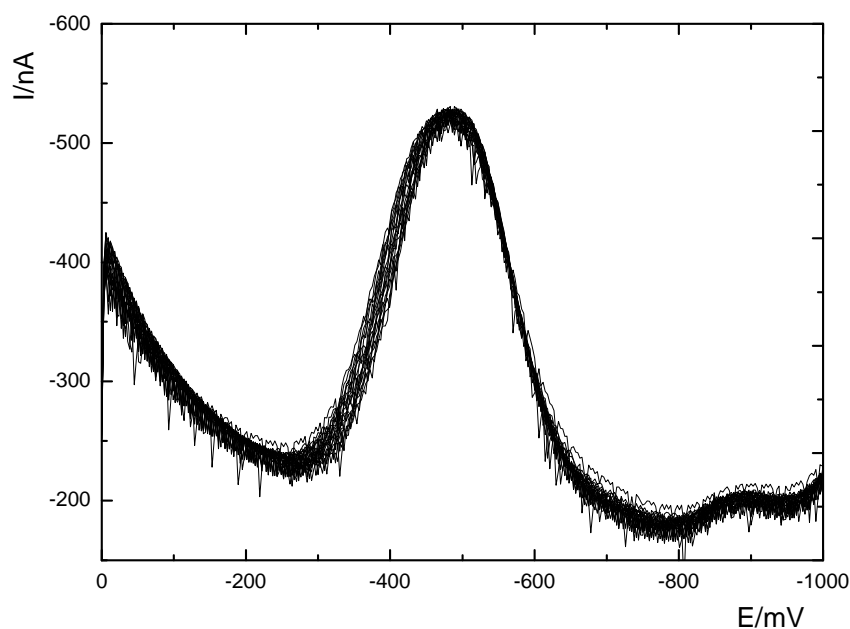
**Obr.16.** DP voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L), měřeno na p-AgSA-CE ve vodných roztocích BR pufrů. Zobrazeny liché hodnoty pH 3,1 (1); 5,1 (2); 7,0 (3); 9,0 (4); 11,1 (5).



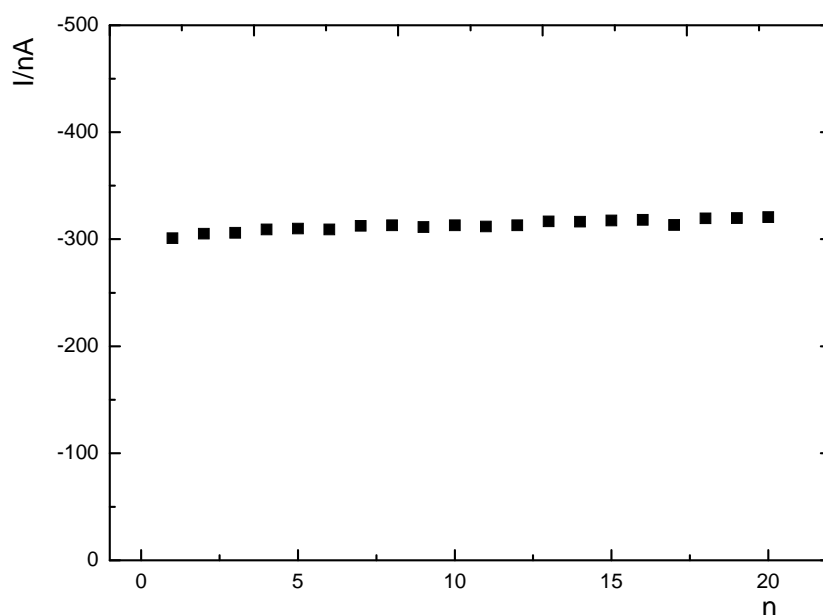
**Obr.17.** DP voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na p-AgSA-CE ve vodném prostředí BR pufru o pH 4,0. Měřeno bez regeneračních potenciálů, počet měření  $n = 20$ .



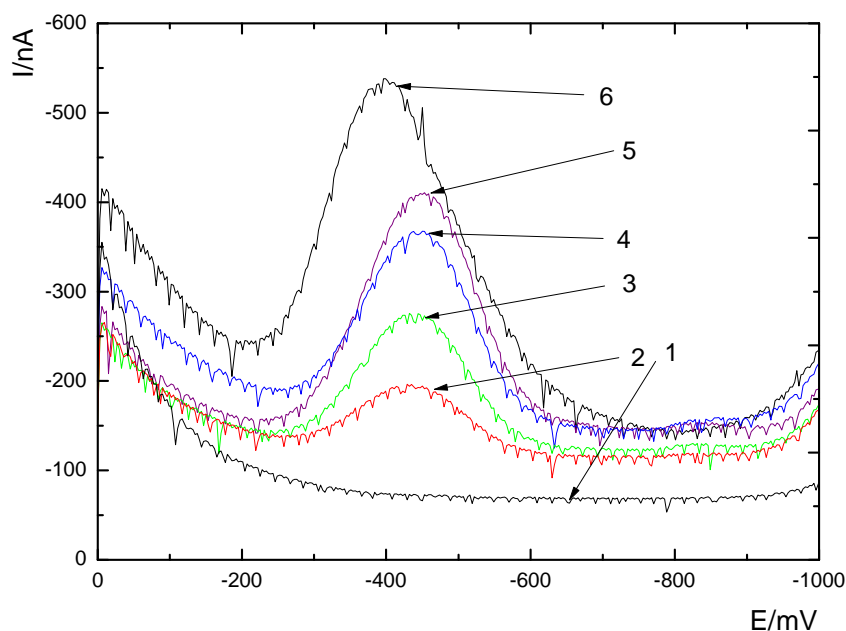
**Obr.18.** Závislost proudu píku metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ) na pořadovém čísle měření bez aplikace regeneračních potenciálů. Měřeno DP voltametří na p-AgSA-CE ve vodném prostředí BR pufru o pH 4,0; počet měření  $n = 20$ .



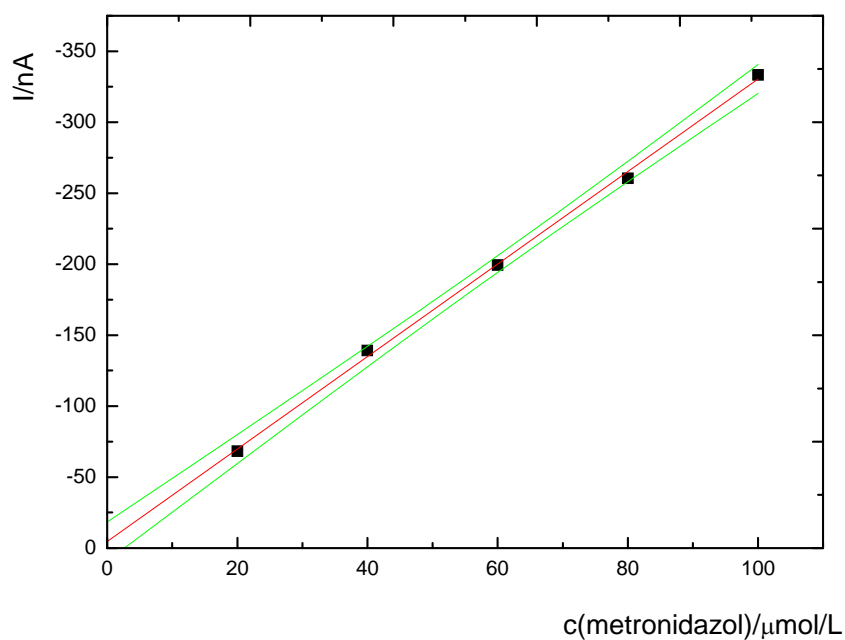
**Obr.19.** DP voltamogramy metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ) na p-AgSA-CE ve vodném prostředí BR pufru o pH 4,0. Měřeno s vložením regeneračních potenciálů před každým měřením ( $E_{\text{in}} = 150 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{fin}} = -1100 \text{ mV}$ ), počet měření  $n = 20$ .



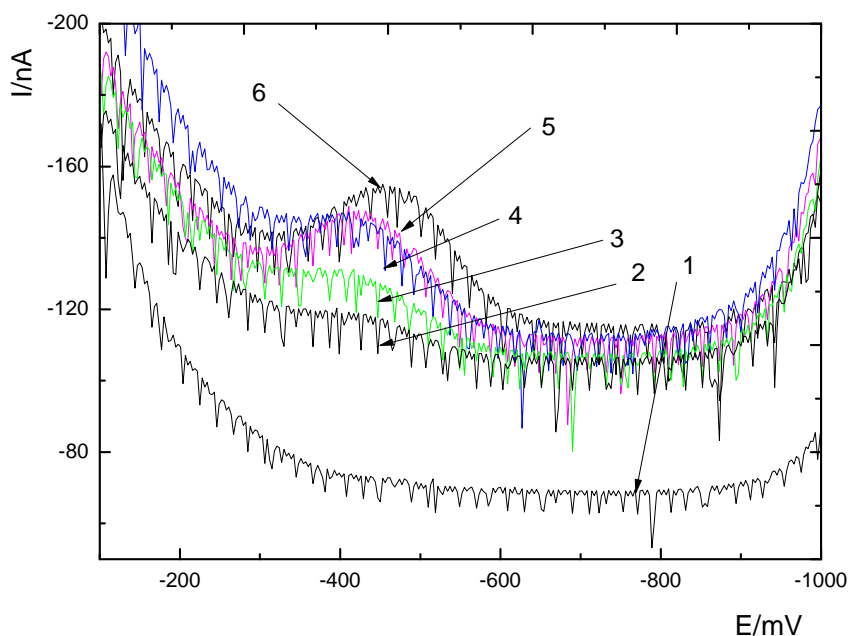
**Obr.20.** Závislost proudu píku metronidazolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/L) na pořadovém čísle měření s užitím regeneračních potenciálů před každým měřením ( $E_{\text{in}} = 150$  mV,  $E_{\text{fin}} = -1100$  mV). Měřeno DP voltametří na p-AgSA-CE ve vodném prostředí BR pufru o pH 4,0; počet měření  $n = 20$ .



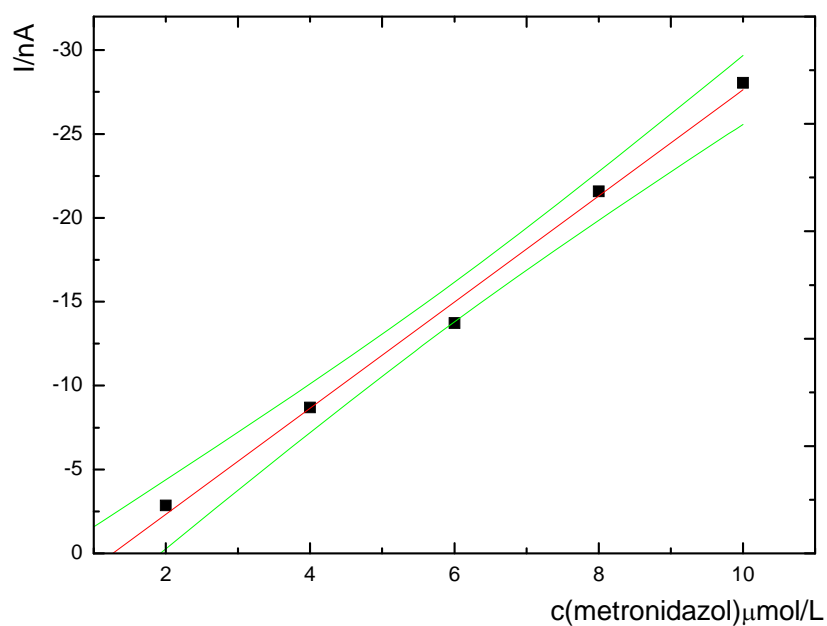
**Obr.21.** DP voltamogramy metronidazolu v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-5}$  -  $10 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Základní elektrolyt (1); koncentrace metronidazolu v mol/L  $2 \cdot 10^{-5}$  (2);  $4 \cdot 10^{-5}$  (3);  $6 \cdot 10^{-5}$  (4);  $8 \cdot 10^{-5}$  (5);  $10 \cdot 10^{-5}$  (6). Měřeno ve vodném roztoku BR pufru o pH 4,0 s aplikací regeneračních potenciálů ( $E_{\text{in}} = 150$  mV,  $E_{\text{fin}} = -1100$  mV).



**Obr.22.** Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-5}$  -  $10 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Měřeno DC voltametrií na p-AgSA-CE ve vodném roztoku BR pufru o pH 4,0 s aplikací regeneračních potenciálů ( $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1100$  mV).



**Obr.23.** DP voltamogramy metronidazolu na p-AgSA-CE v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $10 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Základní elektrolyt (1), koncentrace metronidazolu(mol/L)  $2 \cdot 10^{-6}$  (2);  $4 \cdot 10^{-6}$  (3);  $6 \cdot 10^{-6}$  (4);  $8 \cdot 10^{-6}$  (5);  $10 \cdot 10^{-6}$  (6). Měřeno ve vodném roztoku BR pufru o pH 4,0 s vložení regeneračních potenciálů ( $E_{in} = 150$  mV,  $E_{fin} = -1100$  mV).



**Obr.24.** Závislost proudu píku na koncentraci metronidazolu v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $10 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Měřeno DP voltametří na p-AgSA-CE ve vodném roztoku BR pufru o pH 4,0 s aplikací regeneračních potenciálů ( $E_{\text{in}} = 150$  mV,  $E_{\text{fin}} = -1100$  mV).

#### Tabulka VII

Parametry kalibračních přímek stanovení metronidazolu DP voltametří na p-AgSA-CE ve vodných roztocích BR-pufu o pH 4.

$c$ [mol/L]	Směrnice [mA·L/mol]	Úsek [nA]	$R$	$L_Q$ [mol/L]
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	3,27	3,8	-0,999	-
$(2-10) \cdot 10^{-6}$	3,13	-3,7	-0,998	$4,3 \cdot 10^{-6}$

### Tabulka VIII

Sstatistické vyhodnocení metronidazolu DP voltametrií na p-AgSA-CE pro nejvyšší koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L a nejnižší koncentraci  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L ve vodném prostředí BR-pufu o pH 4,0; počet měření  $n = 10$ , hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

$c$ [mol/L]	$\tilde{x}$ [nA]	$L_{1,2}$ [nA]	$s$ [nA]	$s_r$ [%]
$1 \cdot 10^{-4}$	-317,1	2,0	3,0	0,95
$2 \cdot 10^{-6}$	-2,55	0,20	0,32	12,7

### 3.3 UV-VIS spektrofotometrické stanovení metronidazolu (srovnávací metoda)

Princip:

Molekulová absorpční spektrometrie UV-VIS je analytická technika určená především pro stanovení koncentrací a také pro identifikaci anorganických i organických sloučenin. Tato technika měří záření o různých vlnových délkách od 200-800nm pohlcené analyzovaným materiálem.<sup>12</sup>

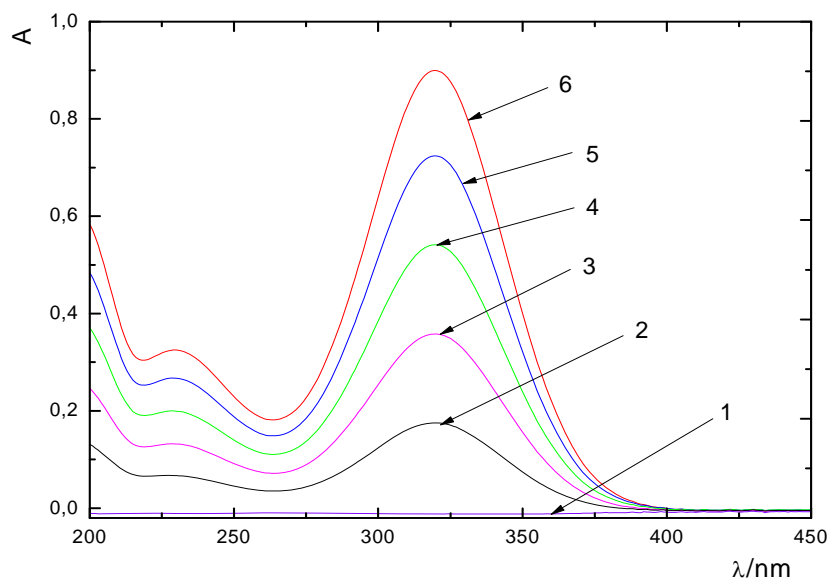
Pro srovnávací metodu analýzy metronidazolu byla zvolena UV-VIS spektrofotometrie. Byla připravena škála kalibračních roztoků metronidazolu v rozmezí od  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L do  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Roztoky byly připraveny odpipetováním příslušného množství metronidazolu ze zásobního roztoku a doplněny destilovanou vodou do 10mL odměrných baněk.

Absorbance takto připravených roztoků byla měřena na přístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA), ovládané programem UV-Visible Chem Station.

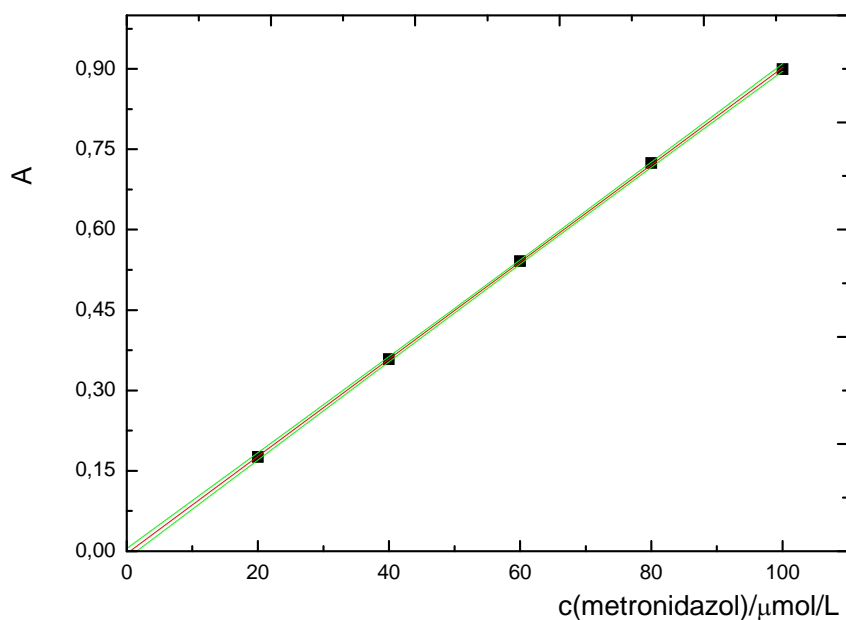
Roztoky byly měřeny v křemenné kyvetě o optické délce 1cm proti destilované vodě v rozsahu vlnových délek 190-1100 nm. Všechny křivky byly změřeny pětkrát.

Na **Obr.25.** a **27.** jsou uvedeny naměřená spektra odpovídajících koncentrací metronidazolu, na **Obr. 26.** a **28.** jsou závislosti absorbance na dané koncentraci metronidazolu.

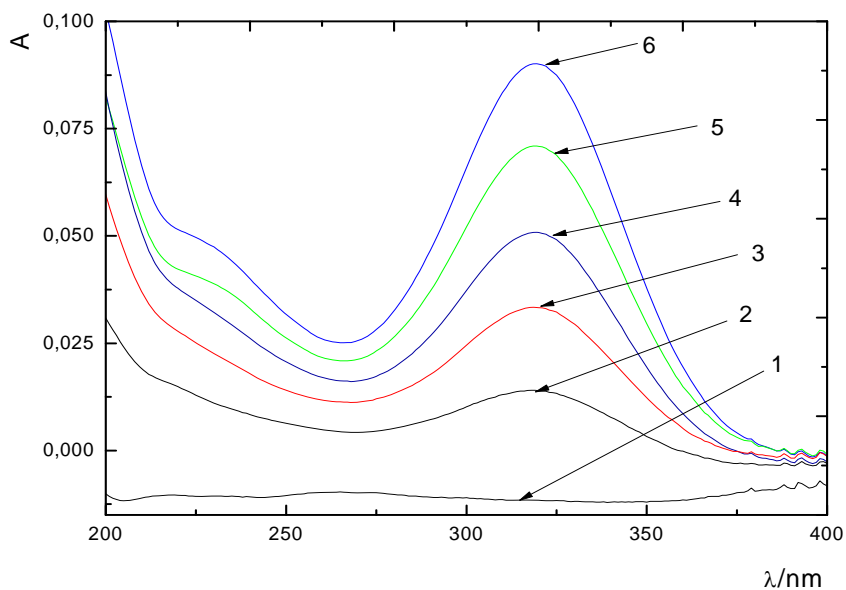




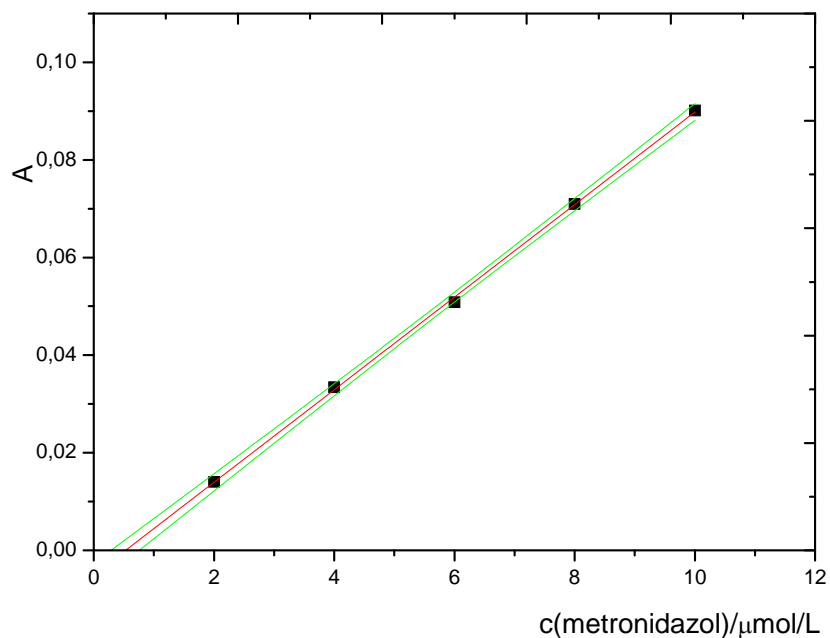
**Obr.25.** Absorpční spektra metronidazolu v destilované vodě, spektra jsou měřena v oblasti vlnových délek 190-1100 nm v křemenné kyvetě o optické délce 1 cm proti destilované vodě. Destilovaná voda (1), koncentrace metronidazolu v mol/L  $2 \cdot 10^{-5}$  (2);  $4 \cdot 10^{-5}$  (3);  $6 \cdot 10^{-5}$  (4);  $8 \cdot 10^{-5}$  (5);  $10 \cdot 10^{-5}$  (6).



**Obr.26.** Závislost absorbance na koncentraci metronidazolu v rozsahu  $2 \cdot 10^{-5}$  -  $10 \cdot 10^{-5}$  mol/L. Absorbance měřena v křemenné kyvetě o optické délce 1 cm proti destilované vodě.



**Obr.27.** Absorpční spektra metronidazolu v destilované vodě, spektra měřena v oblasti vlnových délek 190-1100 nm v křemenné kyvetě o optické délce 1cm proti destilované vodě. Destilovaná voda (1), koncentrace metronidazolu  $2 \cdot 10^{-6}$  (2);  $4 \cdot 10^{-6}$  (3);  $6 \cdot 10^{-6}$  (4);  $8 \cdot 10^{-6}$  (5);  $10 \cdot 10^{-6}$  (6).



**Obr.28.** Závislost absorbance na koncentraci metronidazolu v rozsahu  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $10 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Absorbance měřena v křemenné kyvetě o optické délce 1cm proti destilované vodě.

**Tabulka IX**

Parametry kalibračních přímek stanovení metronidazolu UV-VIS spektrofotometrií ve vodných roztocích.

$c$ [mol/L]	Směrnice [L/mol]	Úsek [nA]	$R$	$L_Q$ [mol/L]
$(2-10) \cdot 10^{-5}$	0,912	0,0	1,000	-
$(2-10) \cdot 10^{-6}$	0,904	0,0	0,999	$4,1 \cdot 10^{-6}$

**Tabulka X**

Statistické vyhodnocení stanovení metronidazolu UV-VIS absorpční spektrofotometrií pro nejvyšší koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L a nejnižší koncentraci  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L v prostředí deionizované vody; počet měření  $n = 10$ , hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Chybí rozměry jednotlivých parametrů

$c$ [mol/L]	$\tilde{x}$	$L_{1,2}$	$s$	$s_r$ [%]
$1 \cdot 10^{-4}$	0,8997	$4,83 \cdot 10^{-5}$	$7,32 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-3}$
$2 \cdot 10^{-6}$	0,0132	$3,06 \cdot 10^{-4}$	$0,38 \cdot 10^{-3}$	2,88

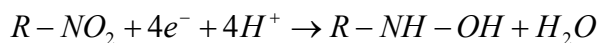
## Shrnutí dosažených výsledků

Analyzovaná látka – metronidazol byla stanovena pomocí DC voltametrie na p-AgSA-CE a DP voltametrie na p-AgSA-CE. Byly nalezeny optimální podmínky pro obě voltametrické metody a zjištěna mez stanovitelnosti. Z vyhodnocení plyne, že nižší mez stanovitelnosti poskytuje DCV (**Tab.X**). Pro porovnání voltametrických metod s jinou analytickou metodou byla použita UV-VIS absorpční spektrofotometrie. Bylo zjištěno, že meze stanovitelnosti jsou u voltametrických a spektrofotometrických metod srovnatelné.

**Tabulka X**

Technika	Prostředí	$L_Q$ [mol/L]
DCV	BR pufr	$2,4 \cdot 10^{-6}$
DPV	BR pufr	$4,3 \cdot 10^{-6}$
UV-VIS absorpční spektrofotometrie	Deionizovaná voda	$4,1 \cdot 10^{-6}$

Byl navrhnut mechanismus redukce nitro skupiny metronidazolu, který zobrazuje následující schéma:



## 4 Závěr

V této práci bylo analyzováno chování metronidazolu při DC voltametrii na leštěné stříbrné pevné amalgamové kompozitní elektrodě. Byly získány optimální podmínky pro stanovení analyzované látky v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L, za optimální prostředí lze považovat vodný roztok BR pufru o pH 4,0. Při tomto pH vykazuje studovaná látka nejvyšší pík. Mez stanovitelnosti je u této metody  $L_Q = 2,4 \cdot 10^{-6}$  mol/L.

Metronidazol byl také stanoven diferenční pulzí voltametrií na leštěné stříbrné pevné amalgamové kompozitní elektrodě. Optimální podmínky byly sledovány v rozsahu koncentrací  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L a optimální prostředí bylo jako v případě DC voltametrie vodný roztok BR pufru o pH 4,0. Mez stanovitelnosti této metody je  $4,3 \cdot 10^{-6}$  mol/L.

Pro porovnání voltametrických metod s jinou analytickou metodou bylo sledováno chování metronidazolu metodou UV-VIS absorpční spektrofotometrií. Analyzovaná látka byla stanovena v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L. Mez stanovitelnosti této metody je  $4,1 \cdot 10^{-6}$  mol/L.

## 5 Literatura

1. Sigma-Aldrich: *Bezpečnostní list – revize 14.3.2010 (Česká republika)*.  
URL: <http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>, staženo 20.5.2010.
2. Státní ústav pro kontrolu léčiv: *Návrh změny výše a podmínek úhrady z moci úřední léčivých přípravků obsahujících metronidazol (ATC kód D06BX01) k lokální aplikaci*.  
URL: [http://www.sukl.cz/uploads/Uredni\\_deska/NHZZ\\_DUBEN/NHZZ\\_D06BX01\\_metronidazol.pdf](http://www.sukl.cz/uploads/Uredni_deska/NHZZ_DUBEN/NHZZ_D06BX01_metronidazol.pdf),  
staženo 20.5.2010.
3. Český lékopis 1997. URL: <http://www.lekopis.cz/>
4. Health Encyclopedia – Diseases and Conditions: *Metronidazole – Symptoms, Treatment and Prevention*.  
URL: <http://www.healthscout.com/ency/1/214/main.html>, staženo 20.5.2010.
5. Jiang X.H., Lin X.Q.: Voltammetry of the Interaction of Metronidazole with DNA and Its Analytical Applications. *Bioelectrochemistry* **68**, 206–212 (2006).
6. Bartlett P.N., Ghoneim E., El-Hefnawy G., El-Hallag I.: Voltammetry and Determination of Metronidazole at a Carbon Fiber Microdisk Electrode. *Talanta* **66**, 869–874 (2005).
7. Wang Z.H., Zhou H.X., Zhou S.P.: Study on the Determination of Metronidazole in Human Serum by Adsorptive Stripping Voltammetry. *Talanta* **40**, 1073–1075 (1993).
8. Jin W.R., Li W., Xu Q., Dong Q.: Quantitative Assay of Metronidazole by Capillary Zone Electrophoresis with Amperometric Detection at a Gold Microelectrode. *Electrophoresis* **21**, 1409–1414 (2000).
9. Mahalingan K., Rajarajen S.: Estimation of Metronidazole and Norfloxacin in Formulations by Reverse Phase HPLC Method. *Arch. Pharm. Sci. & Res.* **1**, 162–165 (2009).
10. Suyagh M.F., Iheagwaram G., Kole P.L., Millership J., Collier P., Halliday H., McElnay J.C.: Development and Validation of a Dried Blood Spot–HPLC Assay for the Determination of Metronidazole in Neonatal Whole Blood Samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 687–693 (2010).
11. Cronly M., Behan P., Foley B., Malone E., Regan L.: Rapid Confirmatory Method for the Determination of 11 Nitroimidazoles in Egg Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **1216**, 8101–8109 (2009).
12. Adegoke A.O., Umoh O.E.: A New Approach to the Spectrophotometric Determination of Metronidazole and Tinidazole Using p-dimethylaminobenzaldehyde. *Acta Pharm.* **59**, 407–419 (2009).
13. Barek J., Pecková K., Vyskočil V.: Kam směřují moderní elektroanalytické metody 50 let po udělení Nobelovy Ceny za polarografii. *Chemické Listy* **103**, 889–893 (2009)
14. Barek J., Opekar F., Štulík K.: Elektroanalytická chemie, str. 82–94. Skripta PFF UK, nakladatelství Karolinum, Praha 2005.
15. Krejčová, Z.: Voltametrické stanovení genotoxického 2-nitrofluorenu pomocí leštěné stříbrné tuhé amalgamové kompozitní elektrody. Bakalářská práce, str. 56. Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Praha 2009.